

TRANSMITTAL LETTER

#4
Inventors: Aron Braun et al.
Serial No: 09/980,194
Filing date: May 12, 2000
Notice of Allowance:

Group Art Unit: Unknown
Examiner: Unknown
Batch:

For: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR PHOTOLITHOGRAPHISCHEN BELICHTUNG VON
BIOLOGISCHEN STOFFEN

Box PCT
Commissioner for Patents
Washington, D. C. 20231

Dear Sir:

Transmitted herewith for the above-identified patent application are the following:

Foreign Priority Claim
A return postcard


The item(s) checked below are appropriate:

1. Applicant(s) hereby petition(s) for a () month extension of time to respond to
an dated

2. X Please charge any fees or costs not accounted for to Deposit Account No. 11-
1755.

3. X Applicant is a small entity.

Date: March 14, 2002


Edward M. Kriegsman
Reg. No. 33,529

KRIEGSMAN & KRIEGSMAN
665 Franklin Street
Framingham, MA 01702
(508) 879-3500

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal
Service as first class mail in an envelope addressed to Box PCT, Commissioner for Patents,
Washington, D. C. 20231 March 14, 2002.


Edward M. Kriegsman

POSTAL MAIL PROCESSING

MAR 27 2012

RECEIVED

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)	
)	
ARON BRAUN ET AL.)	
)	
Serial No.: 09/980,194)	Group Art Unit: Unknown
)	
Int'l. Filing Date: May 12, 2000)	Examiner: Unknown
)	
For: VORRICHTUNG UND)	
VERFAHREN ZUR)	
PHOTOLITHOGRAPHISCHEN)	
BELICHTUNG VON)	
BIOLOGISCHEN STOFFEN)	

Box PCT
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

FOREIGN PRIORITY CLAIM

In connection with the above-identified U.S. patent application, Applicant hereby claims the benefit under 35 U.S.C. 119 of the following foreign application for which a certified copy has already been communicated to the U.S. Patent and Trademark Office by the IB:

Country: Germany

Application Number: 199 22 941.4


Filing Date: May 14, 1999

If there are any fees due in connection with the filing of this paper that are not accounted for, the Examiner is authorized to charge the fees to our Deposit Account No. 11-1755. If a fee is

required for an extension of time under 37 C.F.R. 1.136 that is not accounted for already, such an extension of time is requested and the fee should also be charged to our Deposit Account.

Respectfully submitted,

Kriegsman & Kriegsman

By: 

Edward M. Kriegsman
Reg. No. 33,529
665 Franklin Street
Framingham, MA 01702
(508) 879-3500

Dated: March 14, 2002

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Box PCT, Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on 3-14-02.


Edward M. Kriegsman

Reg. No. 33,529

Dated: March 14, 2002

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 25 JUL 2000

WIPO

PCT

DE 00/1540

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 22 941.4

Anmeldetag: 14. Mai 1999

Anmelder/Inhaber: Epigenomics GmbH,
Berlin/DE

Bezeichnung: Vorrichtung und Verfahren zur photo-
lithographischen Belichtung von biologischen
Stoffen

IPC: G 03 F, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 23. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoib

Vorrichtung und Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen

- 5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen.

10 DNA-Chips sind kleinste, meist planare Oberflächen, auf welchen räumlich geordnet eine große Anzahl verschiedener Oligomere (kurze, einsträngige DNA-Moleküle) angebracht sind. Solche Chips werden beispielsweise zur parallelen Erkennung zahlreicher DNA-Sequenzen in einer präparierten Gewebeprobe verwendet. Dazu benetzt man die Chipoberfläche
15 che mit einer Lösung von einsträngigen DNA-Stücken aus der Gewebeprobe, worauf sich komplementär passende DNA-Stücke aus der Lösung an die entsprechenden, an die Chipoberfläche angebrachten Oligomere anlagern (Hybridisierung). Danach bestimmt man mit einer geeigneten Methode
20 wie z.B. Fluoreszenzmarkierung, an welchen Stellen auf dem Chip eine Hybridisierung stattgefunden hat. Wenn man weiss, wo auf dem Chip welche Oligomere angebracht sind, kann man somit Rückschlüsse auf DNA-Sequenzen in der Gewebeprobe machen. Dazu definiert man in der Regel auf der
25 Chip-Trägerfläche ein dichtes rechtwinkliges Raster. Auf jedem Rasterpunkt ist in Form eines kleinen Flecks genau eine Sorte von Oligomer angebracht. Die maximal mögliche Anzahl von verschiedenen DNA-Sequenzen auf dem Chip ist demzufolge gleich der Anzahl der Rasterpunkte. Da man
30 möglichst viele Sorten von Oligomeren auf einen Chip aufbringen will, die Chips aber gleichzeitig so klein wie möglich sein sollten, um effektiv hybridisiert werden zu können, ist es ein wichtiges Ziel bei der Herstellung von DNA-Chips, eine möglichst hohe Rasterdichte zu erreichen.

Im Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur DNA-Chip Herstellung bekannt.

1) Alle Oligomere werden auf herkömmliche Weise einzeln
5 im Reagenzglas synthetisiert und danach an den vorgesehenen Rasterpunkten auf den Träger aufpipettiert, typischerweise von einer automatischen Micropipettieranlage. Diese Methode ist sehr aufwendig und teuer, da jedes Oligomer einzeln hergestellt bzw. gekauft und von Hand der
10 Pipettieranlage zugeführt werden muss. Die Rasterdichte ist durch die hohe Winkelungenauigkeit der heute verfügbaren, typischerweise piezoelektrischen Mikropipetten stark limitiert.

2) Die Oligomere werden mit Hilfe einer automatischen Mikropipettieranlage direkt auf dem Chip synthetisiert. Auf
15 jedem Rasterpunkt wird die dort vorgesehene Oligomerkette Baustein für Baustein (Nukleobasen) aufgebaut. Das chemische Verfahren ist grundsätzlich das selbe wie bei der
20 herkömmlichen Oligomer-Synthese im Reagenzglas. Der Unterschied ist, dass alle Oligomere gleichzeitig, von einer einzigen automatischen Anlage direkt am vorgesehenen Bestimmungsort hergestellt werden. Die bei Methode 1) separaten Arbeitsschritte Oligomer-Synthese und Micropipettierung werden somit zu einem einheitlichen Arbeitsschritt zusammengefasst. Diese in situ Synthese läuft
25 normalerweise wie folgt ab: Auf einem vorpräparierten Substrat tropft der Pipettierautomat sequentiell auf jedem Rasterpunkt die dort vorgesehene erste Nukleobase
30 auf. Dies ist mechanisch nicht sehr aufwendig, da es nur 4 verschiedene Nukleobasen (C, T, G, A) gibt. Man kann dafür z.B. 4 aneinandergeschaltete Mikropipetten verwenden. Nach dem Auftragen des ersten Nukleosidbausteins auf
jedem Rasterpunkt wird das Substrat gewaschen und nach
35 einem "Capping Schritt" die Schutzgruppen an den 5'-OH Funktionen entfernt, um die Reaktion mit dem jeweils

nachfolgenden Nukleosidbaustein zu ermöglichen. Danach wird an jedem Rasterpunkt die zweite Nukleobase aufpipettiert. Das Substrat wird dann wieder gewaschen und entschützt. Auf diese Weise baut man Schritt für Schritt auf jedem Rasterpunkt die jeweils erforderlichen Oligomerketten auf. Diese Methode ist nicht besonders schnell, da nacheinander auf jedem Rasterpunkt für jede Nukleobase neu pipettiert werden muss. Wie bei Methode 1) ist die Rasterdichte durch die Ungenauigkeit der Micropipetten beschränkt. Die Ungenauigkeit wirkt sich hier noch schlimmer aus, da jeder Rasterpunkt mehrmals nacheinander auf möglichst identische Weise getroffen werden muss.

3) Die Oligomere werden wie bei 2) direkt auf dem Träger synthetisiert, die gezielte Anbindung der richtigen Nukleobasen an den richtigen Rasterpunkten geschieht jedoch durch eine vollkommen parallele, photolithographische Technik anstelle von sequenziellen, zielgenauen Pipettierschritten. Das Verfahren basiert darauf, dass man mit Licht einer bestimmten Wellenlänge gezielt die 5'-OH Schutzgruppen von Oligonukleotiden entfernen kann. Durch geeignete örtliche Bestrahlungsmuster kann man somit Oligonukleotid-Enden an genau jenen Rasterpunkten reaktionsfähig machen, an denen man im nächsten Schritt eine neues Nukleosid anbringen will. Bei vollständiger Benetzung der Chipoberfläche mit einer Nukleotidbaustein-Lösung wird somit nur an den vorher belichteten Stellen ein Nukleotidbaustein angebunden, alle unbelichteten Stellen bleiben unverändert. Die örtlichen Belichtungsmuster werden erzeugt, indem man eine microphotographische schwarzweiss Maske zwischen dem Substrat und der Lichtquelle positioniert, die alle Rasterstellen abdeckt, die nicht reaktionsfähig gemacht werden sollen. Die Verlängerung der Oligomer-Ketten auf allen Rasterpunkten um eine Nukleobase geschieht demnach wie folgt: Mit Hilfe einer ersten Maske werden genau jene Rasterpunkte belichtet, welche um

die erste der 4 möglichen Sorten von Nukleobasen (z.B. C) erweitert werden müssen. Danach wird der Chip mit einer Lösung des entsprechenden Nukleotidbausteins benetzt, worauf nur die belichteten Punkte um diese Base verlängert werden. Da die neu angebundenen Basen noch alle über eine Schutzgruppe verfügen, werden sie in den folgenden Schritten nicht weiter reagieren, bis ihre Schutzgruppen durch eine weitere Belichtung abgespaltet werden. Nach diesem Reaktionsschritt wird der Chip gewaschen. Nun werden mit Hilfe einer zweiten Maske genau jene Rasterstellen belichtet, welche um die zweite der 4 möglichen Sorten von Nukleobasen (z.B. T) erweitert werden müssen. Darauf wird der Chip wiederum mit einer Lösung des entsprechenden Nukleotidbausteins benetzt und die belichteten Stellen dadurch um diese Base verlängert. Genauso verfährt man für die verbleibenden zwei Basen (z.B. G und A). Für die Verlängerung aller Oligomere um eine Nukleobase benötigt man demzufolge vier Belichtungsschritte bzw. 4 Photomasken. Diese Methode ist wegen der hohen Parallelität sehr effizient, zudem ist sie wegen der hohen Präzision, die mit Photolithographie erreicht werden kann, geeignet, um sehr hohe Rasterdichten zu erzielen. Allerdings ist die Methode sehr aufwendig und somit teuer, da man für die Herstellung einer bestimmten Sorte von Chip zuerst eine grosse Anzahl von Photomasken erzeugen muss. Bei hohen Rasterdichten werden zudem hohe Anforderungen an die Positionierungsgenauigkeit der Masken während der Belichtung gestellt, die effizient nur durch Verwendung von teuren Apparaturen erfüllt werden können.

4) Es wird dasselbe Verfahren angewandt wie bei 3), nur verwendet man anstelle der grossen Zahl von photographischen Masken eine einzige, transmissive Flüssigkristallanzeige, die elektronisch angesteuert wird und als dynamische Maske dient. Diese Methode ist einfach und billig, da keine photographischen Masken erzeugt werden

müssen und das Positionierungsproblem entfällt. Ein mögliches Problem dieser Methode ist der limitierte optische Kontrast der heute verfügbaren Flüssigkristallanzeigen (maximal 1:100). Das Lichtintensitätsverhältnis zwischen belichteten und abgedeckten Punkten wird dadurch reduziert, was eine Ausbeuteverminderung bei der Oligomersynthese zur Folge haben kann.

Diese Methoden nach dem Stand der Technik weisen eine Reihe von Nachteilen auf. Unter den oben beschriebenen Herstellungsmethoden für DNA-Chips ist die photolithographische Methode mit dynamischen Flüssigkristall-Masken die einzige, die eine einfache, billige und zuverlässige Herstellung von Chips mit hoher Rasterdichte erlaubt. Der mangelhafte Kontrast der Flüssigkristallanzeigen hat jedoch eine Verminderung der Qualität der Oligomerpunkte zur Folge, was letztendlich die Detektionsempfindlichkeit des Chips vermindert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung zu schaffen, welche die Nachteile des Standes der Technik überwindet. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Schaffung eines weiteren Verfahrens zur photolithographischen Belichtung biologischer Stoffe.

Die Aufgabe wird durch die kennzeichneten Merkmale des Hauptanspruchs gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den abhängigen Unteransprüchen gekennzeichnet.

30

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine Vorrichtung zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen geschaffen wird, umfassend mindestens eine Lichtquelle, ein Lichtleiterbündel und eine Steuerungseinheit, wobei jeder der Lichtleiter unabhängig von-

einander mit Licht ansteuerbar und/oder Licht in diesen einkoppelbar ist.

5 Bevorzugt ist es dabei, daß die Lichtquelle monochromatisches oder kontinuierliches Licht in einem Wellenlängenbereich von 100 bis 800 nm aussendet. Besonders bevorzugt ist es, daß die Lichtquelle ein Laser, eine Leuchtdiode, eine Metalldampflampe, eine Gasentladungslampe, eine Gasanregungslampe, eine Glühfadenlampe oder eine Lichtbogenlampe ist.

10 Weiterhin vorteilhaft ist es, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter Leuchtdioden und/oder optische Schalter angeordnet sind.

15 Besonders vorteilhaft ist es ferner, daß zu belichtende Stoffe direkt an den Enden der Lichtleiter aufgebracht sind. Bevorzugt ist es aber auch, daß zu belichtende Stoffe auf einem separaten Träger angeordnet sind.

20 Ganz besonders bevorzugt ist es, daß zu belichtende Stoffe auf einem separaten Träger angeordnet sind, wobei dieser Träger ein DNA-Chip, ein PNA-Chip oder ein Peptid-Chip ist.

25 Erfindungsgemäß weist die Vorrichtung vorzugsweise zusätzlich mindestens einen Detektor auf.

30 Bevorzugt ist dabei, daß mindestens einer der Detektoren derart angeordnet ist, daß dieser das zur Belichtung verwendete Licht erfaßt und/oder mindestens ein Detektor derart angeordnet ist, daß dieser das von den belichteten Stoffen reflektierte und/oder durch Fluoreszenz erzeugte Licht erfaßt und daß zur Lichtführung für die Detektoren
35 gegebenenfalls Lichtleiter und/oder Lichtleiterbündel

vorgesehen sind. Insbesondere bevorzugt ist hierbei, daß die Detektoren CCD-Detektoren und/oder CCD-Kamera sind.

5 Ganz besonders bevorzugt ist es, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter eine dynamische Maske vorgesehen ist. Besonders bevorzugt ist es auch, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter ein Satz von statischen Masken vorgesehen ist.

10 Äußerst bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Vorrichtung, wobei die Lichtquelle ein solches Spektrum von Wellenlängen emittiert, welches die Entschützung von Nukleotiden, Nukleotidanaloga und Peptid-Nukleinsäurebausteinen zur Kettenverlängerung und zum Aufbau von Oligomeren bewirkt
15 und daß zwischen dieser Lichtquelle und dem Substrat ein Bündel von Lichtleiterfasern angeordnet ist, in welche jeweils durch gezielte Ansteuerung selektiv Licht einkoppelbar ist und daß hinter dem Lichtleiterbündel die Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet, präzise
20 und starr positioniert ist und daß die Festphase, auf welcher die Oligomersynthese stattfindet, in einer Kammer angeordnet ist, in die durch weitere Vorrichtungen die zur DNA oder PNA Synthese notwendigen Lösungen und/oder Reagenzien an diese Festphase heranführbar sind.

25 Bevorzugt ist es erfindungsgemäß hierbei, daß man als Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet, einen separaten Träger anordnet. Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, daß die Enden der Lichtleiterfasern selbst
30 die Festphase zur Durchführung der Oligomersynthese sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen, wobei man diese auf einer Oberfläche
35 oder am Ende eines Lichtleiters anordnet und mittels Licht, welches durch Lichtleiter geführt ist und aus ei-

ner Lichtquelle stammt, welche am anderen Ende der Licht-
leiter angeordnet ist, belichtet, wobei man jeden Punkt,
welcher einem Lichtleiterende gegenüberliegt, unabhängig
von den anderen Punkten belichtet, wobei man das Belich-
5 tungsmuster mittels einer Steuerungseinheit vorwählt.

Bevorzugt ist es hierbei nämlich zur Belichtung von DNA-
oder PNA-Chips, daß man Licht der Wellenlängen verwendet,
welches die Entschützung von Nukleotiden, Nukleotidanaloga
10 und Peptid-Nukleinsäurebausteinen zur Kettenverlängerung
und zum Aufbau von Oligomeren bewirkt und daß man zwischen
dieser Lichtquelle und dem Substrat ein Bündel von Lichtleiterfasern
anordnet, in welche jeweils durch gezielte Ansteuerung selektiv
Licht eingekoppelt wird und
15 daß man hinter dem Lichtleiterbündel die Festphase, auf der
die Oligomersynthese stattfindet, präzise und starr positioniert
und daß man die Festphase, auf welcher die Oligomersynthese
stattfindet, in einer Kammer anordnet, in die man durch weitere
Vorrichtungen die zur DNA oder
20 PNA Synthese notwendigen Lösungen und/oder Reagenzien an
diese Festphase heranführt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, daß man nach erfolgter
Oligomerisierung auf den DNA- oder PNA-Chips weiterhin die
nachfolgenden Hybridisierungen mit einer Ziel-DNA durchführt.
25

Erfindungsgemäß ist ferner ein Verfahren, wobei man zur
Durchführung des Verfahrens eine erfindungsgemäße Vorrichtung
30 verwendet.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die erfindungsgemäße
Vorrichtung eine einfache und preiswerte photolithographische
Herstellung von DNA-Chips hoher Rasterdichte mit einem Belichtungs-
35 kontrast von weit über 1:100 ermöglichen. Dadurch wird erstmals
die einfache Produktion von

qualitativ hochstehenden DNA-Chips in jedem beliebigen Labor möglich.

5 Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das Verfahren lösen die gestellte Aufgabe auf völlig neuartige Art und Weise durch Kombination kommerziell erhältlicher Komponenten. Es ermöglicht die billige Herstellung von DNA-Chips in einer Qualität, wie sie vorher nicht möglich war.

10 Das grundlegende Konzept der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des Verfahrens besteht darin, dass man ein bestimmtes Belichtungsmuster auf dem Substrat nicht durch gezielte Abdeckung von Rasterpunkten mit Hilfe einer statischen oder dynamischen Maske erzeugt, sondern indem man
15 individuell jedem zu belichtenden Rasterpunkt das Licht direkt über einen optischen Lichtleiter zuführt. Es muss also über jedem Rasterpunkt das Ende einer optischen Lichtleiterfaser so angebracht sein, dass bei Lichteinkopplung in die Faser das am Ende austretende Licht genau den entsprechenden Rasterpunkt beleuchtet. Es werden
20 folglich genau so viele Lichtleiterfasern benötigt wie Rasterpunkte vorgesehen sind. Um so beliebige Belichtungsmuster erzeugen zu können, muss unabhängig für jede einzelne Lichtleiterfaser gesteuert werden können, ob ihr zu einem gegebenen Zeitpunkt Licht eingekoppelt wird oder nicht. Durch gezieltes Einkoppeln bzw. nicht Einkoppeln von Licht in die richtigen Fasern kann man somit bei jedem Belichtungsschritt ausschliesslich jene Rasterpunkte belichten, die aktiviert werden müssen, während man alle
25 anderen unbelichtet lässt.
30

Das gezielte Einkoppeln von Licht in die jeweils richtigen Fasern muss vollautomatisch elektronisch gesteuert werden können, damit die Methode einfach durchführbar
35 ist. Eine mögliche technische Lösung ist, am Anfang jedes Lichtleiters eine eigene, elektrisch ein- und ausschaltba-

re Lichtquelle (z.B. eine Laserdiode richtiger Wellenlänge) anzubringen. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von kommerziell erhältlichen, elektrisch ansteuerbaren optischen Schaltern. Es handelt sich dabei um eine

5 Hardware-Komponente mit 2 Anschlüssen für 2 Lichtleiterfasern und einem elektrischen Steuerungseingang. Durch ein elektrisches Signal am Steuerungseingang kann bestimmt werden, ob die beiden Lichtleiterfasern optisch verbunden werden sollen oder nicht. Für jeden Rasterpunkt

10 benötigt man somit einen optischen Schalter und zwei Lichtleiterfasern. Dem freien Ende der ersten Faser koppelt man permanent Licht ein, das freie Ende der zweiten Faser dient als Lichtausgang und wird über dem jeweiligen Rasterpunkt befestigt. Für die Lichteinkopplung genügt

15 eine einzige Lichtquelle, wenn man alle Eingangsfasern entsprechend bündelt.

Für die elektrische Steuerung sind beide Methoden der gezielten Lichteinkopplung gleichwertig. Man benötigt lediglich eine Ansteuerelektronik, die jeden Rasterpunkt

20 individuell adressieren kann. Grundsätzlich spielt es keine grosse Rolle, ob man dabei Leuchtdioden oder optische Schalter ansteuert.

25 Eine weitere Möglichkeit zur gezielten Lichteinkopplung in die einzelnen Fasern des Lichtleiterfaserbündels ist die Verwendung von automatisch positionierten statischen Masken (z.B. Photo- oder Lochmasken) oder einer elektronisch ansteuerbaren dynamischen Maske (z.B. LCD), welche

30 man zwischen die Lichtquelle und die Eingangsseite des Faserbündels bringt. Mit den Masken kann man gezielt jene Fasereingänge verdecken, in die beim jeweiligen Belichtungsschritt kein Licht eingekoppelt werden soll. Die Masken können dabei geometrisch anders angeordnet und

35 insbesondere viel größer sein als die zu belichtende Arrayfläche, da auf der Einkopplungsseite das Lichtleiter-

bündel beliebig aufgefächert bzw. in die einzelnen Fasern aufgetrennt werden kann.

Für die maximal erzielbare Chip-Rasterdichte ist es
5 grundsätzlich irrelevant, wieviel Platz das Lichteinkopp-
lungssystem (einzelne Lichtquellen, optische Schalter,
statische oder dynamische Masken) beansprucht. Die
Rasterdichte ist allein davon abhängig, wie dicht man die
Faserenden bündeln kann, an denen das Licht austritt.
10 Diese Möglichkeit der geometrischen Verdichtung stellt
den wesentlichsten Nutzen der Erfindung dar. Bei einem
typischen Faserdurchmesser um 100 Mikrometer kann man auf
der Belichtungsseite ungefähr 10000 Rasterpunkte auf ei-
nem Quadratzentimeter erreichen, was für viele Anwendun-
15 gen hinreichend ist.

Falls es zu aufwendig ist, die über dem Substrat anzu-
bringenden Lichtleiterfaserenden in einem gleichmässigen,
rechtwinkligen Gitterraster anzuordnen, kann man auch ein
20 ungeordnetes Faserbündel über dem Substrat befestigen.
Die Punkte auf einem so angefertigten Chip sind dann
nicht mehr rasterförmig, sondern zufällig und unregelmä-
ßig angeordnet. Trotzdem sind bei allen Chips, die mit
derselben Lichtleiteranordnung hergestellt worden sind,
25 die Positionen der Punkte identisch. Grundsätzlich kann
man wissen, welche Oligomersorte an welcher Stelle des
Chips synthetisiert worden ist. Es genügt für eine gege-
bene Syntheseanordnung mit zufälliger Lichtfaserbünde-
lung, ein einziges Mal nacheinander jedem einzelnen
30 Lichtleiter Licht einzukoppeln, und mit einem hochauflö-
sendem CCD-Detektor, der in die Substratebene gelegt
wird, die Position der austretenden Lichtkegel festzu-
stellen. Auf diese Weise kann man eine vollständige Ta-
belle mit der Zuordnung aller Ansteuerungsadressen zu den
35 entsprechenden x-y Substratpositionen erstellen. Diese
Information verwendet man später bei der Auswertung aller

Chips, die mit der entsprechenden Anordnung hergestellt werden.

Für eine Auswertung nach dem Fluoreszenzmarkierungsverfahren kann man optional die selbe ungerasterte Lichtleiteranordnung verwenden, die man bei der Herstellung verwendet hat, nur dass man nun am anderen Faserende nicht Licht einkoppelt, sondern mit Photodetektoren das jetzt stellenweise auf der Substratseite eintretende Fluoreszenzlicht misst. Dazu muss man an Stelle der Lichtquelle(n) an jedem Faserende einen separaten Photodetektor anbringen. Ein solches optisches Lesesystem mit Lichtleitern kann die Chip-Detektion gegenüber der herkömmlichen Detektionsmethode mit CCD-Detektoren erhebliche vereinfachen.

Eine sehr interessante und neuartige Anwendungsvariante des hier beschriebenen DNA-Chip Syntheseverfahrens ist die Synthese von Oligomeren direkt auf den Lichtleiterenden anstatt auf einem separaten Substrat. Dies kann erreicht werden, indem man die Lichtleiterfaser-Endflächen, durch die das Licht austritt, auf ähnliche Weise chemisch präpariert wie sonst bei herkömmlichen DNA-Chips Trägerfläche. Dadurch wird jedes Lichtleiterende selber zu einem kleinen, unabhängigen Träger, auf welchem man nun mit der üblichen photolithographischen Chemie genau eine Sorte von Oligomer synthetisieren kann. Das photoaktivierende Licht wird somit nicht mehr von aussen auf die Trägeroberfläche aufgestrahlt, sondern tritt direkt an der Trägeroberfläche aus dem transparenten, lichtleitenden Trägermaterial aus. Statt einer einzigen Trägerfläche mit vielen verschiedenen, kleinen Oligomerpunkten hat man nun eine Vielzahl von getrennten kleinen Trägerflächen mit je einer Sorte von Oligomer darauf. Wie bei den herkömmlichen Chips müssen die Oligomerpunkte dicht beieinander liegen, damit sie für eine effiziente Hybridisie-

rung verwendet werden können. Dies kann wie oben beschrieben durch dichte Bündelung der Faserenden erreicht werden.

5 Bei einer solchen Synthese auf Lichtleiterenden bleibt die hergestellte Oligomerpunkteschar untrennbar mit der zur Herstellung verwendeten Vorrichtung verbunden. Hybridisierung und anschliessende Detektion werden dann ebenfalls an den Lichtleiterenden vorgenommen, wobei man für
10 eine Fluoreszenzdetektion wieder die Lichtleiter in umgekehrter Richtung zum Auslesen der Fluoreszenzsignale verwendet. Nach einem Synthese-Hybridisierung-Detektionszyklus kann man die Lichtleiterfaserspitzen chemisch reinigen und die Vorrichtung somit für eine Neue
15 Synthese bereitmachen.

Die vorliegende Erfindung soll anhand der beigefügten Zeichnung näher erläutert werden.

20 Es zeigen:

Fig. 1 den schematischen Aufbau einer ersten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei welcher die Ansteuerung der Fasern durch optische Schalter dargestellt ist;
25

Fig. 2 den schematisch Aufbau einer zweiten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei welcher die Ansteuerung der Fasern durch einzelne Lichtquellen dargestellt ist;
30

Fig. 3 den schematischen Aufbau während der Belichtung eines separaten Trägers (Chip) und

Fig. 4 den schematischen Aufbau während der Belichtung, wobei sich das Substrat direkt an den faserenden befindet.

5 In Figur 1 ist ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung dargestellt. Aus der Lichtquelle A wird mittels der Lichtleiter F das Licht über die elektrisch angesteuerten optischen Schalter B auf den Array-Träger C geleitet. Die Steuerung S, vorzugsweise
10 ein Computer, sorgt für die entsprechende Ansteuerung der einzelnen Schalter B in vorgegebener Weise in Form einer dynamischen oder statischen Maske.

15 In Figur 2 ist ein zweites Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung dargestellt. Aus einer Vielzahl von der Lichtquellen A wird mittels der Lichtleiter F das Licht auf den Array-Träger C geleitet. Die Steuerung S, vorzugsweise ein Computer, sorgt für die entsprechende Ansteuerung der einzelnen Schalter A in vorgegebener Weise. Auch hier kann die Ansteuerung in Form einer
20 dynamischen oder statischen Maske erfolgen.

Figur 3 zeigt im Detail, wie die einzelnen Substratpunkte E auf dem Array-Träger C durch die Lichtleiterfasern F belichtet werden.
25

In Figur 4 ist gezeigt, daß die Substrate direkt an der Enden der Lichtleiterfasern F angeordnet sind.

30 Dem Fachmann ist klar, wie die einzelnen Bauteile in einer erfindungsgemäßen Vorrichtung anzuordnen sind. Auch die entsprechende Programmierung der Steuerung mittels Computerprogrammen ist dem Fachmann an sich bekannt.

Bezugszeichenliste

- A: Lichtquelle
- 5 B: elektrisch angesteuerter optischer Schalter
- C: Array-Träger
- D: Substrat an den Faserenden
- E: Substratpunkte auf dem Array-Träger
- F: Lichtleiterfaser
- 10 S: Steuerung (Computer)

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen, umfassend mindestens eine Lichtquelle, ein Lichtleiterbündel und eine Steuerungseinheit, wobei jeder der Lichtleiter unabhängig voneinander mit Licht ansteuerbar und/oder Licht in diesen einkoppelbar ist.
2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle monochromatisches oder kontinuierliches Licht in einem Wellenlängenbereich von 100 bis 800 nm aussendet.
3. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle ein Laser, eine Leuchtdiode, eine Metaldampflampe, eine Gasentladungslampe, eine Gasanregungslampe, eine Glühfadenlampe oder eine Lichtbogenlampe ist.
4. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter Leuchtdioden und/oder optische Schalter angeordnet sind.
5. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zu belichtende Stoffe direkt an den Enden der Lichtleiter aufgebracht sind.
6. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zu belichtende Stoffe auf einem separaten Träger angeordnet sind.
7. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zu belichtende Stoffe auf

einem separaten Träger angeordnet sind, wobei dieser Träger ein DNA-Chip, ein PNA-Chip oder ein Peptid-Chip ist.

- 5 8. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung zusätzlich mindestens einen Detektor umfaßt.
- 10 9. Vorrichtung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Detektoren derart angeordnet ist, daß dieser das zur Belichtung verwendete Licht erfaßt und/oder mindestens ein Detektor derart angeordnet ist, daß dieser das von den belichteten Stoffen reflektierte und/oder durch Fluoreszenz erzeugte Licht erfaßt und daß zur Lichtführung für die Detektoren gegebenenfalls Lichtleiter und/oder Lichtleiterbündel vorgesehen sind.
- 15 10. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoren CCD-Detektoren und/oder CCD-Kameras sind.
- 20 11. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter eine dynamische Maske vorgesehen ist.
- 25 12. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ansteuerung der einzelnen Lichtleiter ein Satz von statischen Masken vorgesehen ist.
- 30 13. Vorrichtung gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle ein solches Spektrum von Wellenlängen emittiert, welches die Entschützung von Nukleotiden, Nukleotidanaloga und
- 35

Peptid-Nukleinsäurebausteinen zur Kettenverlängerung und zum Aufbau von Oligomeren bewirkt und daß zwischen dieser Lichtquelle und dem Substrat ein Bündel von Lichtleiterfasern angeordnet ist, in welche jeweils durch gezielte Ansteuerung selektiv Licht ein-
koppelbar ist und daß hinter dem Lichtleiterbündel die Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet, präzise und starr positioniert ist und daß die Festphase, auf welcher die Oligomersynthese stattfindet, in einer Kammer angeordnet ist, in die durch weitere Vorrichtungen die zur DNA oder PNA Synthese notwendigen Lösungen und/oder Reagenzien an diese Festphase heranführbar sind.

14. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet, einen separaten Träger anordnet.
15. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Enden der Lichtleiterfasern selbst die Festphase zur Durchführung der Oligomersynthese sind.
16. Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen, wobei man diese auf einer Oberfläche oder am Ende eines Lichtleiters anordnet und mittels Licht, welches durch Lichtleiter geführt ist und aus einer Lichtquelle stammt, welche am anderen Ende der Lichtleiter angeordnet ist, belichtet, wobei man jeden Punkt, welcher einem Lichtleiterende gegenüberliegt, unabhängig von den anderen Punkten belichtet, wobei man das Belichtungsmuster mittels einer Steuerungseinheit vorwählt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, nämlich zur Belichtung von DNA- oder PNA-Chips, dadurch gekennzeichnet, daß man Licht der Wellenlängen verwendet, welches die

Entschüttung von Nukleotiden, Nukleotidanaloga und Peptid-Nukleinsäurebausteinen zur Kettenverlängerung und zum Aufbau von Oligomeren bewirkt und daß man zwischen dieser Lichtquelle und dem Substrat ein Bündel von Lichtleiterfasern anordnet, in welche jeweils durch gezielte Ansteuerung selektiv Licht eingekoppelt wird und daß man hinter dem Lichtleiterbündel die Festphase, auf der die Oligomersynthese stattfindet, präzise und starr positioniert und daß man die Festphase, auf welcher die Oligomersynthese stattfindet, in einer Kammer anordnet, in die man durch weitere Vorrichtungen die zur DNA oder PNA Synthese notwendigen Lösungen und/oder Reagenzien an diese Festphase heranführt.

18. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man nach erfolgter Oligomerisierung auf den DNA- oder PNA-Chips weiterhin die nachfolgenden Hybridisierungen mit einer Ziel-DNA durchführt.

19. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Durchführung des Verfahrens eine Vorrichtung gemäß Anspruch 1 verwendet.

Zusammenfassung

5 Es wird eine Vorrichtung und ein Verfahren zur photolithographischen Belichtung von biologischen Stoffen beschrieben, umfassend mindestens eine Lichtquelle, ein Lichtleiterbündel und eine Steuerungseinheit, wobei jeder der Lichtleiter unabhängig voneinander mit Licht ansteuerbar und/oder Licht in diesen einkoppelbar ist.

10

Die Vorrichtung ist insbesondere zur Belichtung von DNA-PNA- oder Peptid-Chips geeignet.

